

# **(第39回未来医学研究会大会より<特集I>) フロントランナー報告iPS細胞を用いた再生医療の実用化に向けた取り組み**

著者名	松浦 勝久
雑誌名	未来医学
号	30
ページ	35-43
発行年	2017-03-15
URL	<a href="http://doi.org/10.20780/00031717">http://doi.org/10.20780/00031717</a>

## フロンランナー報告

iPS細胞を用いた  
再生医療の  
実用化に向けた取り組み

東京女子医科大学 先端生命医学研究所  
東京女子医科大学 循環器内科（兼任）

松浦 勝久

Katsuhisa Matsuura



## はじめに

2016年と2017年は、それぞれマウスiPS細胞<sup>1</sup>とヒトiPS細胞<sup>2</sup>の報告から10年の年である。この10年、欧米はもとより日本でもiPS細胞を用いた再生医療の実現に向け精力的に研究開発が進められており、その成果が論文だけでなくプレスリリースとしてマスコミで報道されることも多い。一方で、再生医療分野での応用は、本稿執筆段階で網膜の1例のみに留まっており、多能性幹細胞を使用する上で解決すべき課題の大きさを表すものとする。

実用化においては、1) 原材料の調達（iPS細胞の樹立、安全性評価、マスターセルバンクの樹立）、2) 移植用目的細胞・組織の生産（ワーキングセルバンクの樹立、大量分化誘導、未分化細胞除去、細胞凍結、組織化）、そして3) 実応用（移植、免疫抑制、フォローアップ）に凡そ分類できよう（図1）。自己のiPS細胞を使用する再生医療が理想的ではあるが、現行の細胞の品質評価にかかる時間とコストを考慮すると、当面他家のiPS

細胞を使用することが現実的であり、日本においては京都大学iPS細胞研究所（CiRA）で樹立されているiPS細胞ストックを使用することで原材料の調達の過程は可能と考える。実応用の過程は実臨床に近く、移植手法に関しては応用する組織・臓器によって開発的要素はあるものの、心臓に対する心筋シート移植においては、すでに骨格筋芽細胞シートの実績もあり、多少の改良のみで対応可能であるとする。また他家iPS細胞の使用を前提とすれば、免疫抑制剤の使用は不可欠である。特にiPS細胞を使用した再生医療においては、腫瘍化など将来的な予測し得ないリスクも存在することから、当面の対象はnon-optionの症例に限定されるべきであり、HLAホモのiPS細胞の使用を前提としても、最大限の移植細胞の生着と機能向上を目標とすれば臓器移植に準じた免疫抑制剤の使用が妥当と考える。

したがって、iPS細胞再生医療の実用化に向けては、移植用目的細胞・組織の生産過程の開発に多くの施設が注力しており、昨年の本誌でも紹介したように、我々は東京女子医大の独自の技術である3次元浮遊攪拌懸濁培養技術によるヒトiPS

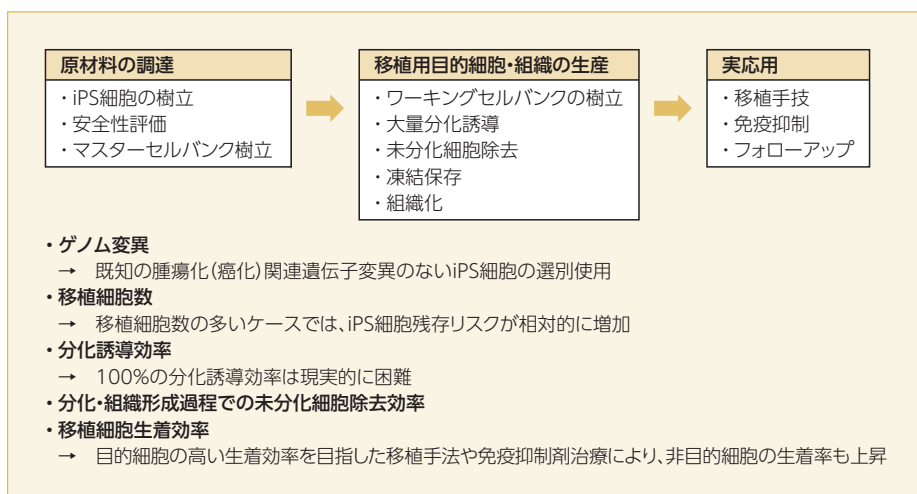


図1 iPS再生医療の細胞・組織生産スキームと腫瘍化リスク要因

細胞由来心筋細胞および細胞シート技術によるヒト心筋組織の量産を可能としている。

多能性幹細胞由来再生医療用製品の実用化の最大のハードルは、腫瘍化のリスク評価とその軽減である。ゲノムの変異による腫瘍化リスクについては、癌患者の予後と遺伝子変異との関連性も依然十分解明されていない中では、マスターセルバンク樹立の段階で、既知の腫瘍化(癌化)と関連のある遺伝子に変異のないものを選別することになる。細胞の継代に伴うゲノム変異リスクを減らすためには、細胞加工施設でのワーキングセルバンクの樹立から分化誘導までを極力短い継代数で行うことが肝要である。

残る腫瘍化リスクは、最終製品中の未分化iPS細胞の残存による腫瘍化であり、移植細胞数、分化効率、未分化細胞除去効率および移植後の生着効率に依存する(図1)。心臓の再生医療においては、一人の症例当たり $1 \times 10^9$ 個の細胞移植が想定されているが、 $10^9$ 分の1の残存iPS細胞を検出できる評価系は現在まで存在しない。したがって、より多くの移植細胞数を要する心筋再生医療では、相対的に未分化iPS細胞残存に伴う腫瘍化リスク

も高いと言える。目的細胞への分化効率100%が達成できるようであれば、残存iPS細胞の問題は回避できようが、80~90%の分化効率が現実である。組織工学を用いて組織として移植すると、単一細胞浮遊液として移植するより大幅に生着効率が<sup>3,4</sup>高く、また心機能改善効果が高いことが明らかとなっているが、生着率の高さは目的とする細胞のみならず、目的外の残存未分化細胞においても同様であり、目的細胞の生着率の高さと未分化細胞残存リスクはトレードオフの関係にある。したがって、未分化細胞の残存リスクの軽減には、極力高い分化誘導効率を維持した上で、分化誘導過程および心筋組織形成過程でいかに未分化細胞を除去できるか、が最後の砦となる。

移植組織中の未分化細胞除去手法開発においては、目的とする分化細胞への毒性は極力少なく、効率的に分化抵抗性の残存未分化細胞のみを除去することが必要である。また特にスキャホールドを使用せずに移植用心筋組織を構築するには、間質細胞が不可欠であることから<sup>5,6</sup>、心筋組織構成細胞へ並べて毒性が少ないことが求められる。再生医療用製品の製造工程は、未分化細胞の維持

培養から、分化誘導、凍結保存および組織形成に至るまで、複数かつ複雑な工程から成ることから、付加的な工程である未分化細胞除去は、より簡便な手法が求められる。すでに筆者らを含め、メチオニン非含有培地など培地成分の改変により未分化iPS細胞除去手法が報告されているが<sup>7</sup>、その実用化には生原基への対応など多くのコストや時間を要する点が課題である。

本稿では、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に向けた取り組みの一つとして、iPS細胞と心筋細胞との高温に対する感受性の相違を利用したiPS心筋組織内未分化iPS細胞除去手法について概説する<sup>8</sup>。分化誘導後の細胞を、42℃に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養することで、iPS細胞が細胞死に至るものであり、極めて簡便な手法と言える。またiPS細胞と心筋細胞の温度感受性の相違の分子機序として、温度感受性チャネルの一つであるTRPV-1 (Transient Receptor Potential Vanniloid-1) の発現レベルの相違が明らかとなったことを踏まえ、TRPV-1活性化低分子化合物による未分化iPS細胞除去手法についても紹介する。

## 温度による 未分化細胞除去手法開発の きっかけ

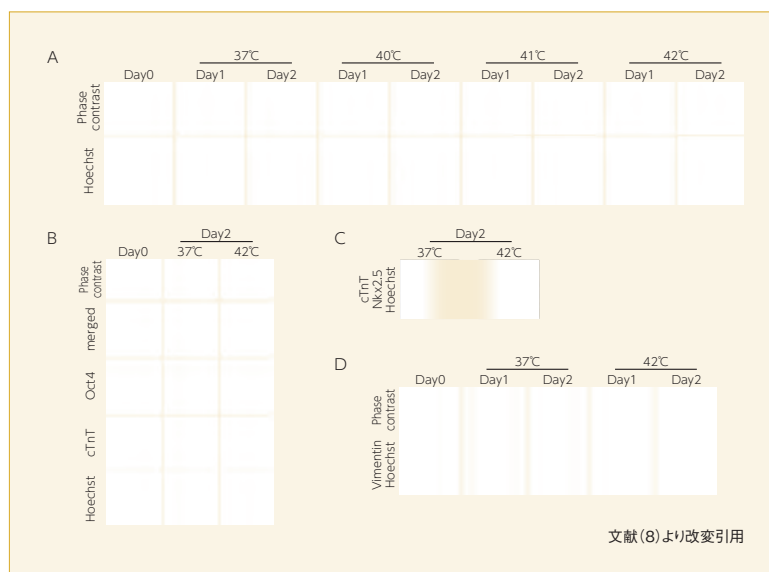
本手法の開発のアイデアは、失敗から生まれたといっても過言でない。3次元浮遊攪拌懸濁培養で心筋細胞の分化誘導をしている時のことである。培地内の温度管理に温度センサーは不可欠であるが、当初のセンサーは培地交換の際に作業員自身で温度センサーを取り外す仕様になっており、培地交換後の温度センサーのつけ忘れによる、ベッセル内の温度上昇事例を数度経験した。当然のことながら、細胞は痛んでしまったと考えたが、一

部サンプリングしてみると、驚いたことに自律拍動している細胞凝集塊を認めたことから、心筋細胞は多少熱に強いのではないかと考えたことが端緒である。

## 42℃は、ヒトiPS細胞にとって 致死の温度である

通常培養温度である37℃での培養を対照に、ラミニン511-E8フラグメント上で維持培養されたフィーダーレスヒトiPS細胞を40℃、41℃、42℃の各温度で2日間培養した。興味深いことに、40℃では、37℃と遜色なく培養2日目までiPS細胞の増殖が観察された。一方、41℃では、培養1日にはiPS細胞の細胞増殖が観察されたが、42℃では、培養1日目にはすでに培養開始前に比して顕著な細胞数の減少が観察され、培養2日後にはほとんどすべてのiPS細胞がアポトーシスにより細胞死に至ることが観察された(図2A)。また6時間以上の42℃培養により、iPS細胞の増殖停止が生じ、12時間以上の培養により細胞死が誘導されることも明らかとなった。

ラミニン511-E8フラグメント上で培養されたフィーダーレスiPS細胞は、主に $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンを介した細胞増殖シグナルが活性化される<sup>9</sup>。一方で、フィーダー細胞上で培養されたiPS細胞は、フィーダー細胞が産生する細胞外マトリックスを介して種々のインテグリンシグナルが活性化されていることから、フィーダーレス培養とは42℃培養の影響に差異が存在することが予測される。そこでフィーダー細胞であるマウス胎仔線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts: MEF)上で維持培養されたヒトiPS細胞を42℃で培養すると、フィーダーレスiPS細胞同様にiPS細胞が時間依存的に細胞死に至ることが明らかとなった。また興味深いことに、42℃培養は、フィーダー細



**図2** 42℃はヒトiPS細胞の細胞死を誘導する  
A：ラミニン511E8フラグメント上で維持培養されたヒトiPS株を37℃、40℃、41℃、42℃で2日間培養した際の位相差顕微鏡画像および核染色画像。B：iPS細胞より分化誘導された心筋細胞、線維芽細胞とiPS細胞を共培養1日後に、37℃、42℃で2日間培養した際の位相差顕微鏡画像および免疫細胞染色画像。C：iPS細胞より分化誘導後純化された心筋細胞を、37℃、42℃で2日間培養した際の免疫細胞染色画像。D：iPS細胞より分化誘導後純化された線維芽細胞を、37℃、42℃で2日間培養した際の位相差および免疫細胞染色画像。

胞であるMEFの細胞数にはほとんど影響しなかったことから、分化細胞は42℃培養に対しある程度の耐性があることが示唆された。

次に、移植用心筋組織環境を模擬するため、iPS細胞より分化誘導した心筋細胞や線維芽細胞とiPS細胞を共培養し、42℃培養の効果を検証した。37℃では培養2日目にはiPS細胞のコロニーの増大を認め、iPS細胞コロニー周囲に心筋細胞が偏在する様子が観察されたが、42℃では、iPS細胞数の顕著な減少が観察されたことから(図2B)、再生心筋組織内においても42℃培養はiPS細胞の細胞死を誘導できることが明らかとなった。

## iPS細胞より 分化誘導された心筋細胞は 42℃培養に耐性を示す

42℃培養がiPS細胞の細胞死を誘導することは明らかとなったが、42℃培養を再生医療用製品の未分化細胞除去手法として活用するためには、目的細胞への影響が少ないことが不可欠であり、再生心筋組織においては心筋細胞と線維芽細胞での検証が必要である。そこでヒトiPS細胞より分化誘導し、純化された心筋細胞および線維芽細胞を42℃で培養したところ、心筋細胞数は37℃で培養した際と有意差なく、また増殖能を有する線維芽細胞においては、37℃で細胞数が増加する一方、42℃では培養前と比して細胞数に有意差を認めな



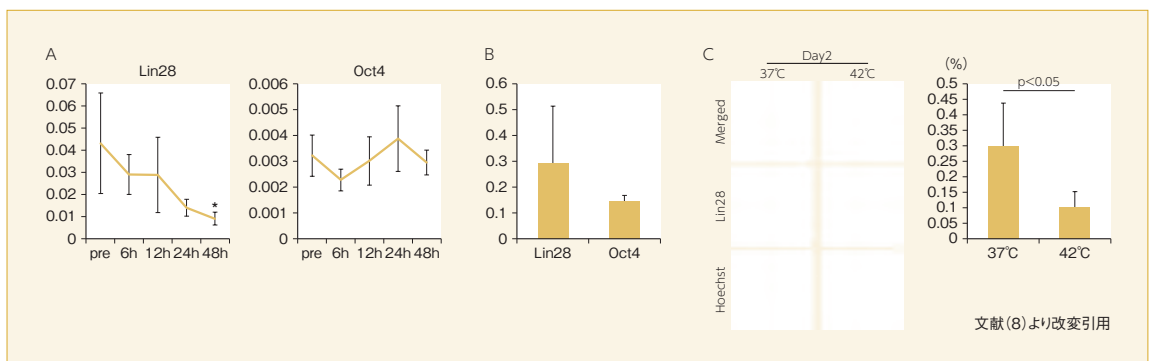
かった(図2 C, D)。またLive/Dead染色による評価では、42℃培養における心筋細胞および線維芽細胞の細胞死の増加は観察されず、さらに多くの心筋収縮蛋白、心筋分泌蛋白およびコラーゲンのmRNAの発現は42℃培養2日までの間に変化せず維持されたことから、2日間の42℃培養は、iPS細胞より分化誘導された心筋細胞および線維芽細胞の細胞死を誘導しないと考えられる。

細胞シート形成には、細胞外マトリックス、細胞間接着タンパクおよび基底膜タンパクなどが不可欠であることから、次に心筋細胞シート形成および機能に対する42℃培養の影響を検証した。ヒトiPS細胞より分化誘導された心筋細胞および線維芽細胞を温度応答性培養皿に播種し、5日間37℃で培養後に温度降下処理を行うことで、単層の心筋シートが回収される<sup>6</sup>。この工程中の2日および3日間42℃培養を行った後に温度降下処理を行っても、同様に単層の細胞シートが形成されたことから、細胞のみならず細胞外マトリックスや基底膜タンパクなど、組織を形成する上で不可欠なタンパクについても影響は少ないことが示唆された。また、2日間37℃ないし42℃で培養した

後に形成された心筋シートをヌードラット皮下に移植すると、移植1週間後にいずれも心筋シートも自律拍動を示し、組織学的評価でも、心筋細胞の生着が観察されたことから、再生医療用組織として使用可能と考えられた。

## 42℃培養は 心筋組織内分化抵抗性未分化 iPS細胞残存リスクを軽減する

iPS細胞を用いた再生医療における腫瘍形成リスクの軽減は、分化誘導後に残存する分化抵抗性未分化iPS細胞の除去に依存するため、残存未分化iPS細胞の除去に関する42℃培養の効果を検証した。iPS細胞より分化誘導された心筋細胞に対し、42℃培養を行うことで、経時的にLin28のmRNA発現レベルは有意に低下し、48時間後にはiPS細胞におけるLin28の発現レベルのおよそ0.3%にまで低下した(図3A, B)。また同様に分化誘導の心筋細胞内には、約0.3%のLin28陽性細胞が免疫染色で検出されたが、2日間の42℃培養により0.1%まで減少した(図3C)。Lin28は、未



**図3** 42℃培養は、iPS心筋組織内未分化iPS細胞を減少させる  
A: iPS細胞より分化誘導された心筋細胞と線維芽細胞を42℃で培養した際の、Lin28およびOct4のmRNA経時的発現変化  
B: iPS細胞より分化誘導された心筋細胞と線維芽細胞を42℃で培養した際の、Lin28およびOct4のmRNA  
C: iPS細胞より分化誘導された心筋細胞と線維芽細胞を42℃で培養した際のLin28陽性細胞の免疫細胞染色画像(左)とLin28陽性細胞割合(右)

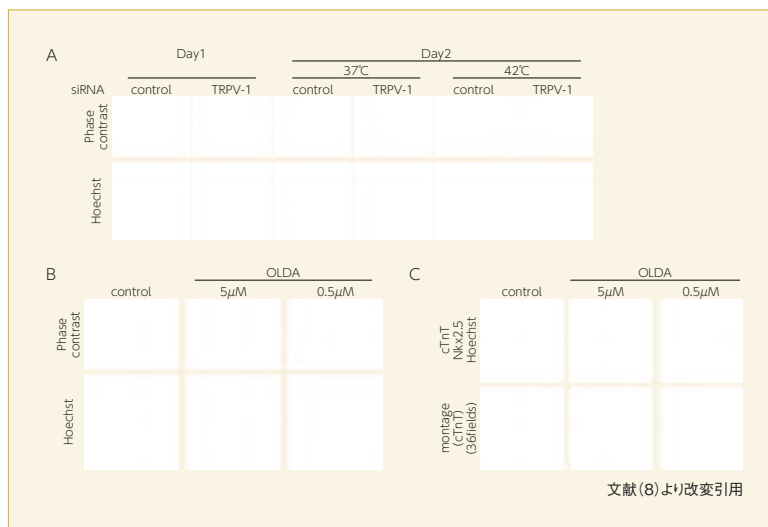


図4 TRPV-1依存性iPS細胞死誘導

A: コントロールおよびTRPV-1に対するsiRNAを遺伝子導入したiPS細胞を37℃および42℃で1日間培養した際の位相差顕微鏡画像および核染色画像。B: OLDA添加1日後のiPS細胞の位相差顕微鏡画像および核染色画像。C: OLDA添加1日後のiPS心筋細胞の免疫細胞染色画像。下段: 心筋トロポニンTの36視野のモンタージュ画像。

分化iPS細胞で発現することは周知だが、分化過程にあるやや幼弱な細胞も、発現レベルは低いもののLin28を発現することが知られている。42℃培養後の組織内では、約0.1%のLin28陽性細胞が認められたが、その発現強度は37℃培養時と比べて顕著に低かったことから、未分化iPS細胞の残存はより少ないものと考えられた。

## TRPV-1の発現上昇を介した42℃培養におけるiPS細胞死

42℃培養は、iPS細胞の細胞死を誘導する一方、心筋細胞や線維芽細胞などの分化細胞への影響は少ないことが明らかとなったが、その詳細な機序は不明である。42℃周辺の高温環境では、温度感受性イオンチャネルの一つであるTRPV-1が活性化されることが知られており、siRNAによりiPS細胞のTRPV-1発現を抑制すると、42℃培養におけ

るiPS細胞死が抑制されたことから、42℃培養はTRPV-1依存性にiPS細胞の細胞死を誘導すると考えられた(図4A)。次にiPS細胞と心筋細胞の42℃培養におけるTRPV-1の経時的発現変化を評価した。42℃培養後、iPS細胞のTRPV-1のmRNA発現は時間依存的に上昇し、特に9時間以降に発現上昇は有意となった。一方、心筋細胞のTRPV-1のmRNA発現レベルも、42℃培養後に時間依存的に上昇したが、42℃培養前後いずれにおいても、iPS細胞のTRPV-1の発現は心筋細胞よりも有意に高かったことから、iPS細胞はTRPV-1発現が高いことで高温環境への感受性が高く、ゆえに42℃で細胞死に陥りやすいものと考えられた。また、上述したように、12時間以上の42℃培養においてiPS細胞の細胞死が誘導されることから、42℃におけるiPS細胞死には、TRPV-1の発現閾値が存在するものと考えられた。

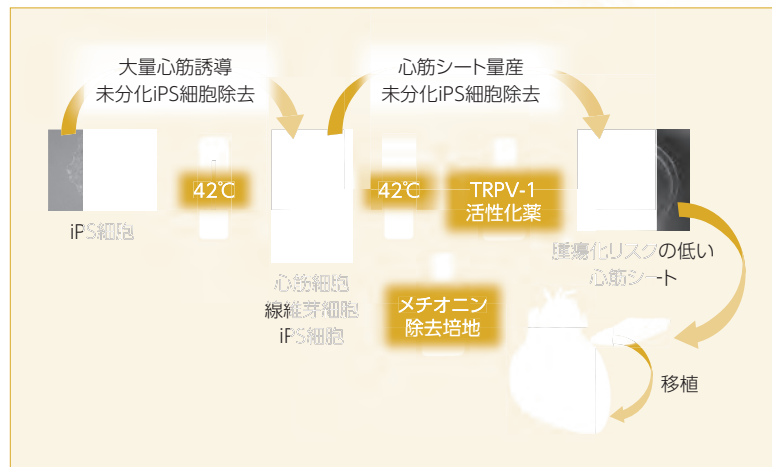


図5 心筋分化誘導過程・心筋シート製造過程での未分化iPS細胞除去手法の導入により、腫瘍化リスクの低い移植用心筋シートを量産する

## TRPV-1 活性化 低分子化合物による iPS細胞除去

42℃培養がTRPV-1依存性にiPS細胞の細胞死を誘導できたことは、TRPV-1の活性化が広くiPS細胞の細胞死誘導に応用可能であることを示すものである。TRPV-1を活性化する複数の低分子化合物を検討した結果、OLDA (N-Oleoyldopamine) がiPS細胞の細胞死を誘導する一方、心筋細胞への毒性が少ないことが明らかとなった(図4B, C)。すなわち5μMのOLDAは、添加1日でラミニン511-E8フラグメント上で維持培養されたほぼすべてのヒトiPS細胞を細胞死に誘導する一方で、心筋細胞数および自律拍動には影響しなかった。またOLDA処理は、42℃培養と同程度にiPS心筋組織におけるLin28の発現レベルを減少させたことから、各種刺激に対するTRPV-1を介した感受性の相違が、iPS細胞より分化誘導された再生医療用心筋組織内の分化抵抗性未分化iPS細胞の残存リスクを軽減させることが明らかとなった。

## 心筋分化誘導過程での iPS細胞除去

上記の通り、心筋組織形成過程での42℃培養が残存iPS細胞の除去に有効であることが明らかとなったが、温度はそもそも3次元浮遊攪拌懸濁培養の重要な制御指標であり、心筋分化誘導過程への応用を検討した。3次元浮遊攪拌懸濁培養での分化15日～16日目にかけて、37℃および42℃で1日間培養を行い、各々の細胞のLin28の発現を比較したところ、42℃培養を行った細胞でLin28の有意な発現低下が観察された。このことから、42℃培養は、組織形成過程のみならず心筋分化誘導過程にも応用可能であると考えられた。

## 終わりに

TRPV-1を活性化する培養温度制御および低分子化合物によるiPS心筋組織内未分化iPS細胞の除去技術について概説した。本技術により、ある程度の残存未分化細胞の除去は可能であることが



明らかとなったが、最初にも述べた10億個程度の細胞移植の腫瘍化リスクをゼロにできるものではない。他の複数のiPS細胞除去手法との組み合わせやin vitroでのiPS細胞残存リスク評価系およびモデル動物への移植における造腫瘍性試験により、最終製品のiPS細胞残存に伴う腫瘍化リスクの評価指標を確立し、腫瘍化リスクのない再生医療用製品を目指すことが肝要である。

## 謝辞

本成果は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生医療実現拠点ネットワークプログラム技術開発個別課題にて実施したものである。

## 略 歴

### 学歴・職歴

- 1999年3月 防衛医科大学校医学科卒業
- 1999年4月 東京女子医科大学循環器内科学 入局／同病院研修医
- 2001年4月 東京女子医科大学大学院医学研究科入学
- 2002年4月 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 特別研究生
- 2006年4月 東京女子医科大学循環器内科 助手（2007年4月 職制変更により助教）
- 2009年12月 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 特任講師 循環器内科（兼任）
- 2014年7月 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 准教授 循環器内科（兼任）
- 2016年6月 大阪大学大学院医学系研究科 招聘准教授（兼任）

### 競争的資金

- 2009年度～2013年度 内閣府最先端研究開発支援プログラム（FIRST） 研究分担者
- 2013年度～ JST/AMED再生医療実現拠点ネットワークプログラム 研究代表者
- 2013年度 経済産業省「iPS細胞等自動培養装置開発加速事業」事業分担者
- 2014年度 横浜市特区リーディング事業 研究分担者
- 2015年度 持田記念医学薬学振興財団 持田記念研究助成
- 2015年度～ 経済産業省シース活用研究開発事業 研究分担者
- 2015年度～ AMED 難治性疾患実用化研究事業 研究代表者

### 所属学会

日本内科学会正会員、日本循環器学会正会員、日本心臓病学会正会員、日本心不全学会（代議員）、日本再生医療学会（代議員）、国際心臓研究学会正会員、日本分子生物学会正会員、アメリカ心臓学会正会員

■参考文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872
- 3) Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, Shimizu T, Okano T, Kasanuki H, Hagiwara N, Komuro I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:2204-2217
- 4) Sekine H, Shimizu T, Dobashi I, Matsuura K, Hagiwara N, Takahashi M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:2973-2980
- 5) Matsuura K, Masuda S, Haraguchi Y, Yasuda N, Shimizu T, Hagiwara N, Zandstra PW, Okano T. Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. *Biomaterials*. 2011;32:7355-7362
- 6) Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425:321-327
- 7) Matsuura K, Kodama F, Sugiyama K, Shimizu T, Hagiwara N, Okano T. Elimination of remaining undifferentiated induced pluripotent stem cells in the process of human cardiac cell sheet fabrication using a methionine-free culture condition. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21:330-338
- 8) Matsuura K, Seta H, Haraguchi Y, Alsayegh K, Sekine H, Shimizu T, Hagiwara N, Yamazaki K, Okano T. Trpv-1-mediated elimination of residual ips cells in bioengineered cardiac cell sheet tissues. *Sci Rep*. 2016;6:21747
- 9) Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E. Laminin e8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2012;3:1236